



دانشگاه علوم پزشکی قزوین

دانشکده پیراپزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد

گروه زیست فناوری پزشکی

موضوع

بیان ژن پروتئین کالپروتکتین و بررسی برهمکنش زیرواحدهای آن با
همدیگر و اثربخشی اسیدهای چرب غیر اشباع بر ساختار آنها

اساتید راهنما

آقای دکتر نعمت الله غیبی

آقای دکتر کوروش گودرزوند

استاد مشاور

آقای دکتر مهدی سهمانی

نگارنده

حمیده اصغری

۱۳۹۲

خلاصه فارسی

چکیده

کالپروتکتین¹ وابسته به خانواده پروتئینهای EF-hand بوده و دارای دو زیر واحد به نامهای S100 A8 (MRP8) , S100 A9 (MRP14) می باشد. این نوع از پروتئین ها با اتصال به کلسیم فعال شده و در داخل و خارج سلول در فرایندهای مهمی نظیر پیام رسانی، تنظیم پاسخ های التهابی، کنترل چرخه سلولی، تمایز، تنظیم فعالیت کانالهای یونی و دفاع در مقابل عوامل میکروبی نقش دارند. کالپروتکتین در پاسخهای التهابی نقش های مختلفی دارد و با اسیدهای چرب غیر اشباع نظیر آراشیدونیک اسید برهمکنش هایی دارد که در تنظیم این پاسخها موثر است. تنها فرم کمپلکس هترو دایمر است که به اسیدهای چرب غیراشباع متصل شده و در برهمکنش با CD36 ماکروفاژها، باعث بالارفتن جذب اسیدهای چرب در سلولهای اندوتلیال می شود. البته این اتصال فقط در حضور کلسیم صورت می گیرد. آنالیز داده های اسپکترومتریک جرمی و مطالعات فیلتراسیون ژل نشان می دهد که هترو دایمریزه شدن S100A8/A9 تنها در حضور کلسیم روی می دهد.

در این مطالعه توالی ژنهای کد کننده S100 A8, S100 A9 انسانی از بانک ژنی NCBI بدست آمد و جهت قرار گیری در وکتور بیانی pET طراحی شد و به یک شرکت تجاری سفارش داده و خریداری شد. این وکتور با روش شوک حرارتی به سلولهای باکتری اشرشیاکلی سویه BL21

¹calprotectin

²interaction

مستعد شده وارد شد و پس از کشت در محیط LB Broth بیان ژن توسط IPTG^۳ القا و در SDS-PAGE^۴ مورد تایید قرار گرفت. سپس این دو پروتئین با روش کروماتوگرافی تمایلی در ستون نیکل تخلیص شده و بدلیل قرار گرفتن درصد بالایی از پروتئین S100A9 در فاز نامحلول و به شکل اجسام توده ای^۵، این پروتئین در محلول حاوی ۶ مولار اوره و بصورت دناتوره تخلیص شد و برای تبدیل آن به حالت طبیعی و خارج کردن اوره دیالیز انجام شد و این موضوع توسط طیف سنجی فلوئورسانس مورد تایید قرار گرفت. زیرواحد S100A8 بصورت محلول تخلیص شد. سپس برهمکنش این دو زیرواحد با همدیگر در حضور یون کلسیم و همچنین برهمکنش این کمپلکس با اسیدهای چرب غیراشباع نظیر اسیدآراشیدونیک، اسیدلینولنیک، اسیدلینولئیک و اسید اولئیک توسط طیف سنجی فلوئورسانس و اسپکتروسکوپی Far-UV CD^۶ بررسی شد. نتایج طیف سنجی نشان می دهد که افزایش کلسیم باعث پایداری^۷ کمپلکس S100A8 و S100A9 می شود و همچنین این یون موجب تغییر اندکی در تغییر ساختار پروتئین از مارپیچ آلفا به صفحات بتا^۸ می شود. در حضور اسیدهای چرب پایداری دمای پروتئین به طور محسوسی کاهش یافته و همچنین نتایج حاصل از اسپکتروسکوپی Far-UV CD نیز نشان از ایجاد تغییر ساختارهای ثانویه و کاهش درصد مارپیچ آلفا در کمپلکس S100A8 و S100A9 دارد.

کلیدواژه ها: کالپروتکتین، S100 A8، S100 A9، بیان ژن، تاخوردگی پروتئین، طیف سنجی فلوئورسانس پروتئین، وکتور pET15b، اسپکتروسکوپی CD، اسیدهای چرب غیر اشباع

³Isopropyl-thio-β-D-galactoside

⁴Sodium dodecyl sulphate Polyacrilamide gel electrophoresis

⁵Inclusion body

⁶Far- Ultra violet Circular dichroism

⁷Stability

⁸β- sheet